

Подсекция «Микробиология»

Устные доклады

Идентификация лактококков, выделенных из природных источников

Барейко Анна Александровна

Институт микробиологии НАНБ, Минск, Беларусь

bareiko.hanna@gmail.com

Бактерии рода *Lactococcus* традиционно используются в качестве стартовых культур для производства ферментированных молочных и мясных продуктов. Поэтому большой интерес представляет выделение из природных источников новых культур лактококков, перспективных для применения в пищевой промышленности.

Из 18 образцов молока и кисломолочных продуктов домашнего приготовления выделено 53 изолята молочнокислых бактерий. На основании данных фенотипической идентификации к представителям рода *Lactococcus* отнесено 30 культур, представляющих собой грамположительные кокки, расположенные в цепочках разной длины, каталазоотрицательные, неподвижные, неспорообразующие. Культуры росли при 10°C и в присутствии 4% NaCl, но не росли при 45°C и на среде с 6,5% NaCl (в отличие от стрептококков и энтерококков). Все культуры являлись факультативными анаэробами, ферментировали глюкозу, лактозу, сахарозу, фруктозу, мальтозу.

Результаты ПЦР с родоспецифичными праймерами L1-lact и L2-lact показали, что из 30 культур, отобранных по фенотипическим признакам, к роду *Lactococcus* относится 21 культура. Проведена видовая идентификация 8 культур лактококков, характеризовавшихся наиболее активным ростом в типовых питательных средах и молоке. На основании данных анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК исследуемые культуры отнесены к виду *Lactococcus lactis*. Плазмидные профили – признак, широко используемый для штаммового типирования и генетической паспортизации бактерий. Охарактеризованы плазмидные профили исследуемых культур лактококков. Показано, что они содержат от 1 до 5 плазмид с разной молекулярной массой. Штаммы, выделенные из молока, не несли плазмид, изолированные из сливок – содержали не менее 1 плазмиды, из сметаны – от 2 до 5 плазмид. Следует отметить, что разные штаммы лактококков характеризовались идентичными плазмидными профилями, и различить их по этому признаку не представлялось возможным.

В дальнейшем предполагается изучить технологически важные свойства идентифицированных культур лактококков и отобрать штаммы, перспективные для использования в пищевой промышленности.

Отдельную благодарность за помощь в работе автор выражает своему научному руководителю, заведующей лабораторией “Коллекция микроорганизмов”, к.б.н. Новик Галине Ивановне, а также н.с. лаборатории “Коллекция микроорганизмов” Сидоренко Анастасии Вячеславовне.

Морфология, ультраструктура и генотоксичность ультрамикрoформ

Aholeplasma laidlawii PG8

Беснятых Юлия Андреевна

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, биолого-почвенный факультет,
Казань, Россия

Dark-Diary@yandex.ru

В культуре *A. laidlawii* PG8 – «вездесущей» микоплазмы, способной инфицировать человека, животных и растения; основного контаминанта клеточных культур – помимо типичных клеток микоплазмы присутствуют ультрамикрoформы, размеры которых меньше, чем размеры обнаруженных в природе нанобактерий – 200 нм.

Значительную роль в адаптации к условиям среды и реализации вирулентности у бактерий могут играть мембранные везикулы – сферические, окруженные мембраной наноструктуры (диаметр 20-250 нм), продуцируемые клетками микроорганизмов.

Характеристика ультрамикрoформ *A. laidlawii* PG8 с точки зрения их морфологии, ультраструктуры, образования и токсигенности явилась целью работы.

Морфологию и ультраструктуру ультрамикрoформ микоплазмы исследовали с помощью трансмиссивной электронной микроскопии. Оценку токсигенности ультрамикрoформ *A. laidlawii* PG8 осуществляли с помощью теста Эймса.

В результате нашего исследования было установлено, что количественное соотношение типичных клеток и ультрамикрoформ на разных стадиях роста культуры *A. laidlawii* PG8 различаются. Согласно трансмиссивной электронной микроскопии, ультрамикрoформы *A. laidlawii* PG8 являются гетерогенной группой по их электронной плотности. Не исключено, что в состав визуализируемых нами ультрамикрoформ входят наноклетки *A. laidlawii* PG8. Однако по размерам, морфологии, ультраструктуре и особенностям образования подавляющее большинство ультрамикрoформ микоплазмы соответствуют мембранным везикулам бактерий.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что ультрамикрoформы *A. laidlawii* PG8 проявляют токсические и генотоксические эффекты в отношении тестерного штамма *S. typhimurium* TA100. Проявление генотоксичных свойств ультрамикрoформ микоплазмы зависит от их концентрации.

Мембранные везикулы бактерий могут содержать разнообразные соединения, обуславливающие токсичность и мутагенность соответствующих наноструктур. Вероятно, ультрамикрoформы *A. laidlawii* PG8 не являются исключением. В связи с широкой распространенностью *A. laidlawii* в природе секретируемые в составе ультрамикрoформ микоплазмы метаболиты, способные обуславливать мутагенные эффекты, представляют значительный интерес как с фундаментальной, так и с практической точек зрения.

Выделение и характеристика целлюлозолитических микроорганизмов, ассоциированных с кишечником жуков-ксилофагов

Замахеев Михаил Владимирович

ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, Россия

cryptochid@mail.ru

В связи с сокращением запасов ископаемого сырья в настоящее время серьезное внимание уделяется вопросам переработки растительной биомассы для получения биотоплива. Поэтому поиск новых целлюлозолитических микроорганизмов, способных эффективно гидролизовать целлюлозу, является актуальным.

Согласно разработанной нами методике препарирования жуков были исследованы микроорганизмы, ассоциированные с кишечником представителей родов *Monochamus*, *Acanthocinus*, *Rhagium*, *Callidium* (сем. *Cerambycidae* - Усачи) и рода *Pissodes* (сем. *Curculionidae* - Долгоносики). При культивировании в аэробных и анаэробных условиях при 28°C из серии накопительных культур было выделено 68 изолятов, проявляющих целлюлозолитическую активность на агаризованной среде с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ). 12 изолятов проявляют активный рост на среде с КМЦ при 50°C.

Количественную оценку целлюлозолитической активности изолятов проводили в процессе культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода органические целлюлозосодержащие субстраты. На 30-е сутки культивирования изоляты проявляют: эндоглюканазную активность – ~0,3 мкМ/мин·мл среды культивирования (определена по реакции на восстанавливающие сахара с использованием КМЦ в качестве субстрата гидролиза); экзоглюканазную активность - ~1 мкМ/мин·мл среды культивирования (определена с использованием р-нитрофенил-β-D-целлобиозида в качестве субстрата гидролиза) и β-глюканазную активность - ~1,26 мкМ/мин·мл среды культивирования (определена с использованием р-нитрофенил-β-D-глюкопиранозида в

качестве субстрата гидролиза). Оптимум рН целлюлозолитической активности для большинства изолятов лежит в двух областях: при рН = 3,6-4,0 и при рН = 5,2-6,0 единиц.

По результатам изучения культурально-морфологических и биохимических свойств изоляты отнесены к следующим семействам микроорганизмов: *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*.

Детекция метаногенных архей в поверхностных водах Черного моря с применением молекулярно-биологических методов

Корнеева Валерия Алексеевна

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,

Москва, Россия

busenica@yandex.ru

Метаногенные археи традиционно считаются строго анаэробными микроорганизмами. Однако некоторые представители данной группы, обладая различными механизмами антиокислительной защиты, способны выживать в присутствии низких концентраций кислорода и сохранять свою активность в анаэробных микронишах, образующихся в аэробных местообитаниях. Ранее, основываясь на профилях содержания метана и радиоизотопном измерении скорости метаногенеза, было доказано существование процесса метаногенеза в поверхностных окисленных водах Черного моря.

В данной работе было проведено определение численности и изучение филогенетического разнообразия метаногенных архей в окисленной водной толще и в зоне хемоклина Черного моря с использованием основных молекулярно-биологических методов.

Методом FISH было показано присутствие в окисленных водах физиологически активных метаногенов, принадлежащих к родам *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* и *Methanosphaera* (35% от численности всех архей) и порядку *Methanomicrobiales* (62%). В нижней зоне хемоклина численности данных групп составляли 11 и 7,3% от всех клеток архей, соответственно.

При проведении ПЦР использовались праймеры, специфичные к участку 16S рДНК архей, участку 16S рДНК метаногенных архей и гену *mcrA*, кодирующему α -субъединицу метил-коэнзим-М-редуктазы всех метаногенов. Археи обнаруживались на всех исследуемых глубинах. По гену 16S рРНК свободноживущие и ассоциированные представители метаногенных архей обнаруживались как в аэробных водах, так и в зоне хемоклина. По участку гена *mcrA* метаногены были детектированы только среди свободноживущих микроорганизмов, как в аэробных водах, так и в зоне хемоклина, но не на всех исследуемых глубинах.

Были получены ДГГЭ профили сообществ архей с исследуемых глубин, отличающиеся количеством и расположением полос амплифицированных участков гена 16S рРНК. Полученные различия хорошо коррелируют с неоднородностью данных водных слоев по гидрохимическим условиям.

Анализ сиквенсов участков гена 16S рРНК, выделенных и реамплифицированных из отдельных полос после ДГГЭ, показал гомологию некоторых образцов с геномами метаногенных архей. Для большинства проанализированных нуклеотидных последовательностей была отмечена 92%-ная гомология с геномом *Methanospirillum hungatei*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 10-04-00220-а. Автор выражает благодарность своим научным руководителям д.б.н. Пименову Н.В. и к.б.н. Брюханову А.Л.

Разработка новых способов молекулярно-генетической характеристики и оценки этиологической роли микроорганизмов при кариесе

Масагутова Нелли Раилевна

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

nelly_m07@mail.ru

Установлено, что кариес возникает при активном участии микроорганизмов. Многочисленные экспериментальные данные и клинические наблюдения подтверждают это

положение, в связи с чем применение антибиотиков значительно снижает частоту заболеваемости.

Показано, что в возникновении кариеса ведущая роль принадлежит *Streptococcus mutans*, который вырабатывает из сахарозы экстрацеллюлярный глюкан, что способствуют развитию адгезивного и высококариесогенного зубного налета. *S. mutans* является ацидогенным микроорганизмом и это определяет его значение в развитии кариеса. Кроме того, большую роль играют также *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus macacae*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*.

Целью исследования было создание основ тест-системы для молекулярно-генетической детекции, идентификации и типирования микроорганизмов, являющихся основными этиологическими агентами при возникновении кариеса.

Основные методы, используемые в работе: полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), микроскопия.

В ходе работы были изучены особенности микробиоты полости рта здоровых, а также больных кариесом людей; были изучены методы выявления кариесогенных микроорганизмов. По международной базе данных GenBank были определены нуклеотидные последовательности *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus sobrinus*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*. Затем были подобраны праймеры к генетическим маркерам, которые являются островками патогенности этих микроорганизмов и генами антибиотикоустойчивости. Определены условия реакции.

Ожидается, что созданные тест-системы будут использованы в практической деятельности в лабораториях, позволят в быстрые сроки идентифицировать возбудителей кариеса и раньше назначать эффективное лечение.

Новый вид бактерий *Agromyces ufaense*, утилизирующий различные соединения углерода

Мухаматдьярова Светлана Ринатовна

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Уфимского
научного центра РАН, Уфа, Россия
svetrm@gmail.com*

Естественное очищение почв, вод и других природных объектов от различных органических загрязнителей является длительным процессом, определяющую роль в котором играют микроорганизмы. Поэтому поиск и идентификация новых видов бактерий, способных к биодegradации органических соединений углерода, является актуальным.

Из образцов техногенно загрязненной почвы с территории промышленного предприятия был выделен бактериальный изолят. Анализ генов 16S рРНК выявил, что его нуклеотидная последовательность имеет низкий уровень сходства (97,44%) с таковой для филогенетически близкородственного типового штамма *Agromyces soli* MJ21(T). Новый микроорганизм получил рабочее название *Agromyces ufaense*.

Целью данной работы являлось описание бактерии по биохимическим и культурально-морфологическим признакам и выявление ее способности к разложению органических соединений, в том числе токсичных.

Микроорганизмы культивировали на жидкой среде Раймонда без пептона при аэрации, 28-30°C в течение 6 суток. Источником углерода служили различные соединения углерода, взятые в количестве 1% (масс).

Agromyces ufaense являются грамположительными, аэробными, неподвижными, не образующими эндоспор, воздушного мицелия и конидий бактериями. Растут в интервале температур от +15 до +37°C. Каталазоположительны, гидролизуют желатину, не гидролизуют крахмал, казеин, не образуют липазы, лецитиназы. Не потребляют малонат, цитрат. Используют в качестве источника углерода углеводы (глюкоза, L-арабиноза, лактоза, мальтоза, L-рамноза, рафиноза, ксилоза и др.), некоторые спирты (маннит, сорбит). Исследуемый штамм *Agromyces ufaense* утилизирует широкий спектр органических веществ: хлорпроизводные углеводов (бутилхлористый, изоамилхлористый, монохлоруксусная кислота), углеводов алканового

ряда (циклогексан, ундекан, додекан, тридекан, тетрадекан), ароматические соединения (вторичный бутилбензол), спирты (аллиловый, пентанол, диэтиленгликоль, триэтиленгликоль), органические кислоты (изовалериановая, капроновая, изомасляная).

Agromyces ufaense в зависимости от используемого источника углерода образует колонии, отличающиеся размерами и окраской.

Модификация новой бактериальной системы экспрессии на основе подбора сигнального пептида

Нямсурэн Ч., Тойменцева А.А.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

chuka_ch@mail.ru

Новая экспрессионная система *Bacillus subtilis* на основе индуцибельного промотора *liaIH* оперона LiaFSR-трёхкомпонентной системы была сконструирована для повышенного выхода целевых белков. LiaFSR-трёхкомпонентная система в клетках бацилл отвечает за целостность клеточной мембраны и может быть активизирована широким спектром антибиотиков, блокирующих синтез клеточной стенки. Промотор (*P_{liaI}*), в сочетании с оптимизацией рибосом связывающего элемента, показал повышенный уровень экспрессии репортерных генов *lacZ* и *gfp* (в 400-1000 раз) при воздействии антибиотика уже через 10-15 минут.

Для направленной продукции промышленно-важных микробных ферментов и гетерологичных белков важным является наличие эффективного сигнального пептида. Показано, что комбинация сильных сигнальных пептидов и экспрессионных систем приводит к повышению белковой продукции в 6-8 раз, а также способствует более эффективной укладке полипептидов. На основе опубликованных ранее работ нами выбраны три сигнальных пептида *Bacillus megaterium* SP_{Asp}, SP_{YngK}, SP_{Пас} способствующих повышенной секреции внеклеточной гидролазы *Thermobifida fusca* (Tfh). Для оптимизации выхода гетерологичных белков сигнальные пептиды клонированы в интеграционный pLIKE-int и репликативный pLIKE-rep вектора. При этом оптимальное расстояние в 7 нуклеотидов между последовательностью Шайна-Дальгарно и стартовым кодоном сохранялось интактным. В качестве модельных белков для исследования влияния выбранных сигнальных пептидов использовались субтилизиноподобная протеиназа (AprVp) и глутамилэндопептидаза (GseVp). Оба фермента обладают ценными свойствами и имеют потенциал использования в биотехнологии и медицине. Для высокой экспрессии этих ферментов применение сильных экспрессионной системы и сигнального элемента может способствовать повышенному уровню продукции.

Выражаю благодарность научному руководителю профессору КФУ Шариповой М.Р.

Работа поддержана Федеральной Целевой Программой “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы”.

Влияние растительных веществ фенольной природы на образование биопленок, синтез сигнальных молекул Quorum sensing систем и миграцию *Pseudomonas aeruginosa*

Плюта Владимир Александрович

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

plyutaba@gmail.com

Бактерии способны «чувствовать» повышение плотности популяции и отвечать на него быстро и скоординированно индукцией определенных наборов генов. Этот тип регуляции получил название Quorum Sensing (QS); он основан на действии низкомолекулярных сигнальных молекул различной природы, которые накапливаются в культуре при высоких плотностях популяции бактерий и взаимодействуют с рецепторными регуляторными белками.

Более 90% бактерий существуют в природных экосистемах в виде специфически организованных, прикрепленных к твердым поверхностям биопленок; биопленки имеют характерную архитектуру и заключены в экзополимерный матрикс. Известно, что у ряда бактерий процесс формирования биопленок зависит от QS.

В настоящей работе мы исследовали действие фенольных соединений растительного происхождения (ФСРП) - оксibenзойной, галловой, хлорогеновой, феруловой, синаповой, кофейной и коричной кислот, ванилина и эпикатехина - на способность бактерии *Pseudomonas aeruginosa* формировать биопленки. Мы показали, что большинство исследованных нами ФСРП в концентрациях, не подавляющих рост бактерий, оказывают стимулирующее действие на способность бактерий *P. aeruginosa* PAO1 формировать биопленки. При более высоких концентрациях ФСРП подавляли образование биопленок. Аналогичное действие оказывали гормоны растений – салициловая, индолил-уксусная, гиббереллиновая и абсцизовая кислоты.

С целью выяснения механизма действия указанных веществ на образование биопленок мы исследовали способность бактерий синтезировать сигнальные молекулы QS систем (N-ацил-гомосерин-лактоны, АГЛ) и миграцию бактерий в присутствии ФСРП. С использованием различных биосенсоров было показано увеличение синтеза АГЛ *P. aeruginosa* PAO1 (N-3'-оксо-додеканоил-гомосерин лактона). Стимуляция образования биопленок, возможно, была связана с увеличением функционирования Las QS системы *P. aeruginosa*.

Было проверено также действие фенольных соединений на способность бактерий к миграции (swarming, swimming и twitching motility) – процессы, которые в ряде случаев связаны с QS-регуляцией. Изученные вещества в концентрациях, не подавляющих рост бактерий, не оказывали стимулирующего действия на миграцию бактерий.

Выявление в вакцинных штаммах *Staphylococcus aureus* генов, ответственных за синтез энтеротоксинов

Пыжикова С.А.¹, Игнатова О.М.¹, Борисова О.Ю.²

¹ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

²ФГУН МНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
pigikiova.s@gmail.com

Проблема внутрибольничных инфекций приобрела исключительно большое значение для всех стран мира, это обусловлено, прежде всего, значительным ростом числа госпитальных штаммов микроорганизмов, обладающих устойчивостью к широкому кругу антимикробных препаратов. Среди возбудителей внутрибольничных инфекций одно из первых мест по-прежнему принадлежит микроорганизмам рода *Staphylococcus*, наиболее патогенным представителем которого является *S. aureus*. Всестороннее изучение вакцинных штаммов *S. aureus*, в том числе определение генов, таких как *sea*, *seb*, *sec*, кодирующих В и С энтеротоксины, ответственных за синтез основных факторов патогенности, и выявление их возможных взаимосвязей с вирулентностью и иммуногенностью штаммов может быть перспективным и в последующем способствовать определению критериев отбора вакцинных штаммов при разработке противостафилококковых препаратов. Вместе с тем, вакцинные штаммы, использованные при разработке Иммуновак-ВП-4[®] и «Стафиловак», не имеют генетической характеристики. Ранее *sra* ген был выявлен только в вакцинном штамме *S. aureus* № 5, одном из менее вирулентных и менее иммуногенных из использованных вакцинных штаммов.

В работе использовано 11 штаммов *S. aureus* - 4 вакцинных (№№ 1986, 1991, 5, 9), 3 контрольных штамма, содержащих, соответственно, *sea*, *seb*, *sec* гены (№№ 264, 243, 493), вирулентный штамм № 6, а также тест-штаммы Wood, Cowan 1 и № 25923. В результате проведения мультиплексной ПЦР, позволяющей одновременно выявить у штаммов *S. aureus* фрагменты *sea*, *seb*, *sec* генов, кодирующих А, В и С энтеротоксины, оказалось, что только единственный штамм *S. aureus* № 5 содержит фрагменты двух генов - *sea* и *seb*, кодирующих А и В энтеротоксины, штамм № 9 содержит фрагменты *seb* гена. Остальные изученные штаммы не содержат фрагменты этих генов, в том числе наиболее вирулентный штамм № 6, используемый как наиболее вирулентный при изучении протективной активности полученных вакцин. Таким образом, фрагменты генов, кодирующих синтез энтеротоксинов, выявлены в двух менее вирулентных и менее иммуногенных из использованных вакцинных штаммов. Следует отметить, что ранее фрагменты *sra* гена, кодирующего синтез белка А, были выявлены лишь в вакцинном штамме № 5 и в штамме № 6. В настоящее время продолжается определение

в вакцинных штаммах *S. aureus* других генов, ответственных за синтез основных факторов патогенности.

Особенности непрерывного процесса образования этанола при иммобилизации дрожжей в гибридных гранулах

Сулова Анна Анатольевна

*Российский государственный университет нефти и газа имени И.М.Губкина, Москва, Россия
annanchous@yandex.ru*

Оптимизация процесса получения этанола актуальна в связи с перспективностью его применения в качестве высокооктанового топлива, как в чистом виде, так и вместе с бензином. С этой целью был изучен процесс образования этанола с помощью дрожжей, иммобилизованных в гибридных полисахаридных гранулах.

Объектом служила музейная культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В работе использовали следующие методы: (а) микробиологические методы выращивания дрожжей, их иммобилизации, а также подбора специальных составов сред; (б) газовой хроматографический метод определения этанола; (в) колориметрический метод определения глюкозы.

Дрожжи иммобилизовали в традиционных альгинатных, а также гибридных гранулах состава альгинат-ксантан в соотношении 9:1. Была подобрана новая реакционная среда для брожения, ее состав (г/л): глюкоза – 150,0; сусло – 3,0; вода водопроводная, рН 5,5-6,0. Эксперименты проводили в статическом режиме, а также проточном в колонне при скоростях протока $1,05 \times 10^{-8}$ м³/с и $2,1 \times 10^{-8}$ м³/с. В статическом режиме выход этанола прямо пропорционален времени выдерживания и существенно повышается при оптимальной температуре 30°C, достигая к 96 ч значений выше 90% от теоретически рассчитанного. При этом не наблюдается ингибирования дрожжей конечным продуктом. Динамика накопления этанола в статических условиях зависит от температуры процесса и природы гранул. В проточном режиме стабильный выход продукта наблюдается при скоростях протока около $1,0 \times 10^{-8}$ м³/с. Процесс с применением гибридных гранул более чувствителен к скорости протока, чем в случае альгинатных. Адаптирован новый количественный экспресс-метод анализа глюкозы в среде, содержащей этанол, и показана его хорошая корреляция с хроматографическим методом. Гранулы с дрожжами длительно сохраняют активность как в процессе ферментации в колонне, так и в условиях хранения при +4-+8°C.

Таким образом, определены некоторые условия оптимизации процесса получения биоэтанола в колонне: тип гранул для иммобилизации дрожжей, состав среды для брожения, температура, режим выдерживания и скорость протока среды.

Идентификация бактериоцинов, образуемых штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К

Устюгова Екатерина Александровна

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия
ustyugova.katya@mail.ru*

Бактериоцины молочнокислых бактерий (МКБ) вследствие своей безопасности и высокой антимикробной активности находят применение в пищевой промышленности в качестве консервантов. В настоящее время широко используется низин А – бактериоцин, образуемый *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, который обладает относительно узким спектром антимикробного действия. Поэтому поиск новых бактериоцинов, продуцируемых МКБ, является актуальным.

Ранее выделенный из коровьего молока Бурятии штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К проявлял антимикробную активность в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий, а также грибов, относящихся к родам *Aspergillus* и *Penicillium*. С помощью твердофазной экстракции и ОФ-ВЭЖХ анализа из культуральной жидкости штамма были выделены 5 компонентов антибиотического комплекса, два из которых являлись бактериоцинами.

Один из бактериоцинов с молекулярной массой 3353 Да был идентифицирован как низин А – известный бактериоцин, относящийся к классу лантибиотиков. Другой бактериоцин – 194-D обладал молекулярной массой 2589 Да и состоял из 20 аминокислот. Бактериоцин 194-D не имел аналогов в компьютерной базе данных биологически активных веществ и являлся новым. Бактериоцин 194-D, в отличие от низина А, обладал более широким спектром антимикробного действия и подавлял рост грамположительных и грамотрицательных бактерий. В зависимости от среды культивирования продуцента содержание бактериоцина 194-D было в 380 - 1123 раза больше, чем низина А. Это говорит о том, что низин А в культуре *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К является минорным. Оба бактериоцина присутствовали только в клеточных экстрактах продуцента, тогда как в супернатанте культуральной жидкости был обнаружен только бактериоцин 194-D. Таким образом, бактериоцин 194-D, обладая широким антимикробным спектром действия, может являться новым перспективным консервантом.

Соединения фенольной природы у цианобактерий

Щербаков Павел Николаевич

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия
cyano@mail.ru*

Проблема разработки методов контроля и управления численностью популяции микроводорослей становится все более значимой в связи с сезонным размножением цианобактерий, что приводит к негативным последствиям для экологии и человека. Вместе с тем цианобактерии являются ценным объектом биотехнологии.

Эффективным регулятором численности может стать использование веществ, синтезируемых самими цианобактериями. Такими веществами могут выступать N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ), индолы, фенольные, гормоноподобные и некоторые другие секретируемые цианобактериями соединения.

Нами оценена способность цианобактерий к синтезу и секреции веществ фенольной природы. Изучены альгологически чистые культуры цианобактерий *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Chlorogloeopsis fritschii* ATCC 27193, *Oscillatoria* sp. CALU 1414, *Oscillatoria* sp. CALU 1416, *Nostoc* sp. CALU 542 и *Gloeocapsa* sp. CALU 743, относящиеся к разным субсекциям. Исследовали лиофильно высушенные препараты культуральной жидкости (КЖ) и биомассы.

Результаты тонкослойной хроматографии и колориметрического метода показали присутствие сходных ФС во всех исследованных экстрактах, причем в экстрактах биомассы ФС больше, чем в КЖ. Отмечена непригодность стандартных метчиков ФС растений для идентификации ФС цианобактерий. Методом ВЭЖХ обнаружено, что исследованные экстракты содержат 3-5 мажорных компонентов и несколько десятков минорных. У большинства обнаруженных соединений на спектрах преобладали максимумы в УФ-С (190-280 нм) и УФ-В (280-315 нм) диапазонах. Присутствовали и компоненты с разрешенными максимумами в сине-зеленой области видимой части спектра. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в КЖ исследованных цианобактерий ФС. Несоответствие положений максимумов поглощения обнаруженных веществ и «классических» максимумов ФС растений может объясняться небольшими различиями в химической структуре. Также обнаружено соединение со временем удерживания $R_t \approx 6,2$ мин, присутствующее в экстрактах *Chlorogloeopsis*, *Oscillatoria*, *Gloeocapsa*. По форме спектра оно имеет фенольно-индольную природу и близко к мономерной форме сцитонемина – особого пигмента, обнаруженного в чехлах некоторых морских и почвенных цианобактерий и играющего важную роль в экранировании УФ радиации. Для идентификации ФС требуются дополнительные исследования.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «У.М.Н.И.К. – сколковец»).

Фракционирование антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, присутствующих в культуральной среде, методом ультрацентрифугирования

Алфредо Элдер

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

helderjr80@yahoo.com

Увеличение заболеваемости туберкулезом, сопровождаемое расширением распространения возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью, и отсутствие высокоспецифичных и чувствительных экспресс-тестов для серодиагностики туберкулеза, пригодных для массового скрининга населения, выдвигают решение этих вопросов в круг первоочередных задач здравоохранения.

Цель настоящего исследования заключалась в определении возможности получения антигенных препаратов из культуральной среды (КС), в которой выращивали *M. tuberculosis*, используя метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

M. tuberculosis культивировали на среде Левенштейна–Йенсена. КС отделяли от бактериальной массы центрифугированием и, дополнительно, фильтрованием через мембранные фильтры «Millipore» (0,45 мкм - 0,22 мкм).

Фракционирование (ротор SW-41, 20000 об/мин, 4 часа) КС методом ультрацентрифугирования проводили в ступенчатом (7,5% - 15% - 30% - 60%) градиенте сахарозы, которую готовили на 0,05 М Трис-НСl буфере, рН 6,8. Отбор фракций из центрифужных пробирок проводили с помощью шприца, последовательно отсасывая материал из верхней части пробирок. Всего было получено 9 фракций, которые исследовались в ИФА.

Результаты анализа свидетельствуют о том, что наиболее высокий коэффициент специфичности наблюдается в 4 фракциях с плотностью сахарозы 7,5%, 15% и 30% (2 подфракции: верхняя и нижняя). На наш взгляд, это говорит о том, что проявляющие высокую антигенную специфичность материалы обладают низкой плавучей плотностью.

Электрофоретический спектр полученных ультрацентрифугированием фракций КС представлен белками с достаточно высокой молекулярной массой более 38 кДа. Следует отметить, что белковый спектр во всех фракционированных материалах достаточно однороден и практически во всех пробах присутствуют фракции с молекулярной массой 45 и 88 кДа.

Таким образом, метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы позволяет получить из КС препараты с большей долей специфических антигенов *M. tuberculosis*, чем они присутствуют в исходной КС.

Влияние лиофильного высушивания на жизнеспособность и антагонистическую активность лактобацилл

Баженова А.Ю.

НТУУ «КПИ», Киев, Украина

nastja.bazhenova@hotmail.com

Метод лиофильного высушивания лактобацилл является наиболее удобным и универсальным методом длительного хранения молочнокислых бактерий. Однако, не смотря на положительные стороны данного метода, учеными были получены результаты, которые гласят, что лиофильное высушивание лактобацилл, напротив, оказывает негативное влияние на физиологическую активность молочнокислых бактерий. Целью данной работы является обзор имеющихся экспериментальных данных о влиянии режима лиофильной сушки на жизнеспособность и биохимическую активность клеток молочнокислых бактерий.

В одном из соответствующих исследований объектами изучения служили 6 штаммов лактобацилл: *Lactobacillus acidophilus* ВКМВ-845, *L. casei subsp. rhamonus* ВКМВ-574, производственный штамм *L. acidophilus* слизистых рас, *L. plantarum* ATCC 10241, *L. lactis* ATCC 8000, *L. casei subsp. casei* № CDO 151. В ходе сравнения антагонистической активности лактобацилл в отношении холерного вибриона до и после лиофильного высушивания

использовались среды следующего состава (г/л): лактоза – 8-14; автолизат селезенки – 7-13; агар-агар – 23; дистиллированная вода – 1 л; NaCl – 8-12; $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 0,12; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,36; pH 6,5-6,8.

Засев материала сразу после лиофилизации показал, что количество жизнеспособных клеток по отношению к исходному составляло всего $(45,8 \pm 5,9)\%$. Следующее хранение привело к ещё большему снижению жизнеспособности лактобацилл. Таким образом, трехмесячное хранение понизило жизнедеятельность молочнокислых бактерий на 15,8%. При исследовании влияния лиофильной сушки на антагонистическую активность данных культур по отношению к холерным вибрионам результаты были схожи. В результате хранения исследуемого материала в течение трех месяцев антагонистическая активность в зависимости от штамма была 43,3-50,1%, в том случае, если исходную активность молочнокислых бактерий в отношении холерного вибриона условно принять за 100%.

Таким образом, имеющиеся экспериментальные данные указывают на явное понижение как жизнеспособности, так и антагонистической активности данных штаммов лактобацилл. При этом количество жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий уменьшилось приблизительно в два раза, а антагонистическая активность в отношении холерного вибриона – на 50-60%. Следует отметить, что последующие исследования материала после его хранения в течение трех месяцев показали увеличение снижения физиолого-биохимической активности данных штаммов лактобацилл.

Некоторые аспекты биологической активности синтезированных фуранонов

Белогова Надежда Викторовна, Бардина Татьяна Сергеевна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Anna.Margulis@ksu.ru

В последнее время появляются данные, что фураноны обладают такими фармакологическими активностями, как противовоспалительная, противоопухолевая, антибактериальная, противогрибковая, противопаразитарная, противовирусная и антиоксидантная. Действие фуранонов приводит к подавлению различных клеточных процессов, регулируемых кворум-сенсингом: биолюминесценции *Vibrio fischeri*; продукции факторов вирулентности у *P. aeruginosa*, *Erwinia carotovora*; образования биопленок. Многие химически синтезированные фураноны значительно эффективнее, чем природные. Целью настоящей работы явилась оценка изменения устойчивости *Staphylococcus aureus* к стрессу при действии галогенизированных фуранонов:

- 1) 5-гидрокси-4-(4-метилфенилсульфонил)-3-хлор-2(5H)-фуранон;
- 2) 5-(4-метилфенилсульфонил)-3,4-дихлор-2(5H)-фуранон.

В ходе работы решались следующие экспериментальные задачи: 1. Охарактеризовать ответ *Staphylococcus aureus* на действие теплового шока (ТШ) 45 и 60°C в течение 15 минут. 2. Оценить воздействие предобработки культуры *S. aureus* фуранонами на динамику роста и способность к колониеобразованию после действия теплового шока. 3. Продемонстрировать эффекты фуранонов на активность ферментов стафилококка в условиях стресса. В ходе эксперимента было показано, что тепловой шок (15 минут) приводит к частичному разрушению клеток стафилококка. Предварительная обработка фуранонами практически не влияла на способность к колониеобразованию после действия ТШ. При этом в вариантах с обработкой фуранонами перед ТШ у клеток стафилококка наблюдали ингибирование протеолитической, лецитиназной и гемолитической активности. Таким образом, исследуемые фураноны действительно снижают вирулентные свойства стафилококка и усиливают эффект теплового шока на клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № 14.740.11.1040 от 23 мая 2011).

Антифунгальные свойства бактерии *Pseudomonas aureofaciens* 2006

Бурова Ю.А., Захаркина А.С., Ревин В.В.

МГУ имени Н.П. Огарева, Саранск, Россия

Burova13@gmail.com

В мире большое внимание уделяется проблеме защиты растений от фитопатогенных грибов, вызывающих различные заболевания. Применение пестицидов приводит как к загрязнению почвы, так и к их накоплению в растениях, что в свою очередь отрицательно влияет на экологию окружающей среды. Использование биопрепаратов на основе почвенных микроорганизмов рода *Pseudomonas* является альтернативой химическим пестицидам. При исследовании новых штаммов необходимо знать степень их воздействия на фитопатогены. В работе исследовали влияние нового штамма *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на рост грибов рода *Alternaria*. Совместное культивирование микроорганизмов проводили на картофельно-глюкозном агаре. Инкубировали культуры при 24–26°C в течение 7 суток. Ингибирующее действие псевдомонад оценивали по зоне подавления роста грибов.

Полученные данные показали, что бактерия оказывает различное микопаразитическое действие в зависимости от используемого тест-объекта. Максимальная зона подавления роста гриба отмечена в варианте с *Alternaria alternata*, на 7-е сутки культивирования она составляла 5-6 мм. В случае с *Alternaria solani* А7МУК4 и *Alternaria infectoria* А7АКТ₁ зона ингибирования к концу наблюдения составляла 2-3 мм. Антагонистическое действие на грибы проявлялось в отсутствии роста и развития фитопатогенов относительно бактерий. Здесь гифы грибов практически вплотную подошли к колонии псевдомонад. Следует отметить, что структура мицелия изменялась по мере приближения к колонии бактерий. Он становился тонким, рыхлым, плотно прилегающим к субстрату. Таким образом, показано, что исследуемая бактерия обладает антифунгальными свойствами и способна сдерживать рост фитопатогенов – возбудителей альтернариоза.

Получение адамализиноподобной металлоэндопептидазы MprVp из рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Валеева Л.Р.

Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, Россия

lia2107@yandex.ru

Адамализины – эукариотические цинкзависимые металлоэндопептидазы клана метцинкинов – участвуют в различных деструктивных процессах в организме человека и осуществляют регуляторные функции на посттрансляционном уровне. Они вызывают в клетке повреждения регуляторных механизмов, что может привести к возникновению и развитию тяжелых патологических процессов. Важная роль этих ферментов в жизнедеятельности человека обосновывает необходимость исследования их структурных и функциональных особенностей для разработки диагностических тестов и новых лекарственных препаратов. Бактериальные ферменты являются идеальной моделью для таких фундаментальных исследований, так как они более удобны и дешевы в получении и обладают высоким потенциалом практического применения. В культуральной жидкости *B. pumilus* 3-19 обнаружена минорная металлоэндопептидаза MprVp – гомолог эукариотических адамализиноподобных эндопептидаз клана метцинкинов. Для изучения свойств и функциональной роли фермента необходимо получить его в гомогенном состоянии.

Цель работы – разработка эффективного способа выделения и очистки из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* металлоэндопептидазы MprVp в гомогенном состоянии и с максимальным выходом продукта.

В работе использован рекомбинантный штамм *B. subtilis* BG2036, несущий плазмиду с геном минорной металлоэндопептидазы MprVp. Выделение из культуральной жидкости проводили в две стадии очистки: осаждение белка сульфатом аммония и хроматография на гидрофобном носителе фенол-сефарозе.

Получен хроматографически гомогенный белок, чистота которого подтверждена электрофорезом в ПААГ. Степень очистки составила 280, выход фермента – 15%. Молекулярная масса определена – 19 кДа.

Разработан простой и эффективный способ очистки фермента из культуральной жидкости рекомбинантного штамма. Получена первая бактериальная эндопептидаза – гомолог эукариотических адамализинов, представляющая большой научный и практический интерес, так как расширяет общие представления об эволюции протеиназ и позволяет исследовать функциональную роль этих ферментов.

Работа поддержана федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

Антибактериальная активность двух форм перспективного лекарственного препарата - рекомбинантной дестабилазы-лизоцима из медицинской пиявки

Го Даньян

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия
guody@mail.ru*

Дестабилаза-лизоцим (Д-Л) из медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* – уникальный белок, проявляющий мурамидазную и специфическую гликозидазную, а также специфическую и неспецифическую изопептидазные активности, при отсутствии пептидазной. В настоящее время внедрение лекарственных препаратов на основе рекомбинантного Д-Л (рД-Л) находится на решающей стадии. После прогревания при 90°C в течение 50 мин мурамидазная активность рД-Л теряется, но сохраняется его способность к антимикробному действию. В настоящей работе исследовали различия в спектре такого действия у исходного белка и его формы, потерявшей мурамидазную активность (рД-Л- t^0), а также изучали электронно-микроскопическую картину разрушения клеток прокариот под действием двух форм рекомбинантного белка.

Установлено, что у (рД-Л- t^0) расширяется спектр антибактериального действия по сравнению с исходным рД-Л благодаря значительному усилению активности по отношению к грамотрицательным бактериям. Это показано на примере нескольких представителей рр. *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Xenorhabdus*. Известно, что представители последнего из указанных родов встречаются в клиническом материале, хотя большинство их являются симбионтами энтомопатогенных нематод. Определены основные стадии картины лизиса контрастированных клеток *Xenorhabdus bovienii* логарифмической фазы роста с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. У большинства исследованных грамположительных бактерий (представителей рр. *Micrococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и других) чувствительность к антибактериальному влиянию (рД-Л- t^0) сохраняется, но обычно уменьшается до нескольких раз по сравнению с чувствительностью к действию исходного белка рД-Л.

Таким образом, лекарственные препараты на основе рД-Л способны не только предотвращать образование тромбов и даже постепенно разрушать образовавшиеся, но и подавлять рост разных микроорганизмов, в том числе - и обнаруживаемых на склеротических «бляшках» сосудов. Возможность приготовления таких препаратов с различающимся спектром антимикробной активности имеет особую значимость.

Изучение влияния этанола на рост продуцента глюкозооксидазы *Penicillium funiculosum* 46.1 и образование им фермента

Демешко Ольга Дмитриевна

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
demeshkoo@mail.ru*

Ферменты – высокоактивные биокатализаторы, производство которых занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии. Среди биокатализаторов следует выделить ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие окислительно-восстановительные реакции и

широко используемые в промышленности, медицине и сельском хозяйстве. Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4.) – представитель класса оксидоредуктаз – является незаменимым реагентом в ферментных и иммуноферментных методах анализа. Она используется в производстве различных типов био-, наносенсоров и биотопливных элементах.

В лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси отобран высокоактивный продуцент глюкозооксидазы – *Penicillium funiculosum* 46.1, на его основе разработана технология получения ферментного препарата. Рентабельность производства глюкозооксидазы *P. funiculosum* 46.1 в значительной степени зависит от уровня образования им фермента, который можно повысить введением в питательную среду эффекторов синтеза. Наибольший интерес представляет этанол, как известный стимулятор синтеза оксидоредуктаз, обеспечивающий повышение образования лакказы *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes versicolor*, *Coriolus hirsutus*, *Grifola frondosa*, Цель данной работы - изучение влияние этанола на рост *P. funiculosum* 46.1 и продукцию глюкозооксидазы.

Для этого вышеуказанное химическое соединение вносили в питательную среду для глубинного культивирования *P. funiculosum* 46.1 в концентрациях 0,05; 0,1%; 0,25%; 0,5%; 0,75%.

В результате проведенных экспериментов установлена зависимость влияния спирта на рост гриба и продукцию им фермента от используемой концентрации. Показано, что добавление этанола в среду во всех исследуемых концентрациях приводит к снижению накопления биомассы грибом на 8-33%. Что касается образования глюкозооксидазы *P. funiculosum* 46.1, то при внесении в среду спирта в концентрациях 0,5 и 0,75% отмечено снижение уровня образования фермента на 8-18%, а 0,05-0,25% – увеличение на 8-19%. Максимальный эффект наблюдался при использовании этанола в концентрации 0,1%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что этанол оказывает стимулирующее действие на образование глюкозооксидазы грибом *P. funiculosum* 46.1 и может быть использован в качестве эффектора синтеза фермента.

Влияние выбросов автотранспорта на микрофлору мерзлотной лугово-черноземной почвы г. Якутска

Жерготова Мария Сергеевна

*Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, биолого-географический факультет, Якутск, Россия
naumova87mari@mail.ru*

Почвы городов постоянно испытывают на себе антропогенный пресс. Среди многочисленных антропогенных воздействий особое место занимает загрязнение выхлопами автотранспорта, в составе которых в почвы поступают тяжелые металлы. Благодаря деятельности микроорганизмов происходят самоочищение почв от поллютантов. Микроорганизмы обладают разными механизмами «нейтрализации» тяжелых металлов в почве: они избирательно могут поглощать ионы металлов, связывать их полисахаридами капсулы, снижая, таким образом, их токсическое воздействие на биоту.

Нами изучено влияние выбросов автотранспорта на численность и состав микрофлоры мерзлотных лугово-черноземных почв г. Якутска. Для этого два раза за вегетационный период 2010 и 2011 гг. отбирали почвенные пробы с глубин 0-10 и 10-20 см на расстоянии 2, 5, 10, 20, 50, 100 и 250 м от наиболее загруженной автомобилями трассы «Аэропорт-Якутск».

Наши исследования показали, что в почвах, расположенных в зоне загрязнения, численность бактерий и актиномицетов колеблется в диапазоне 10^5 - 10^6 КОЕ/г, а микромицетов – в диапазоне 10^1 - 10^3 КОЕ/г. При приближении к автотрассе проявляется тенденция повышения численности олигонитрофильных бактерий и бактерий, использующих органические источники азота. Для актиномицетов и грибов характерна более сложная картина с несколькими пиками численности на разном расстоянии от источника загрязнения. На фоне широкого колебания численности микроорганизмов разных эколого-трофических и таксономических групп наблюдается закономерное изменение в таксономическом составе микробного комплекса почв. При приближении к источнику загрязнения в микробоценозе изменяется относительное

содержание актиномицетов и бактерий. Если в почвах фонового участка (250 м от автотрассы) на долю актиномицетов приходится 70-80% от общего содержания микроорганизмов, а на долю бактерий 20-25%, то в наиболее загрязненных почвах (2-50 м от автотрассы) резко возрастает доля бактерий – до 75-80%, а участие актиномицетов уменьшается до 20-25%. Эта закономерность коррелирует с накоплением в почвах валового свинца и цинка.

Изучение влияния иммобилизованного пробиотика «Рисо-Лакт» на адгезивные свойства эпителиальных клеток кишечника крыс ИЕС-6

Кистаубаева Аида Сериковна

КазНУ им. аль-Фараби, факультет биологии и биотехнологии, кафедра биотехнологии,

Алматы, Республика Казахстан

aida_kaz@mail.ru

Пробиотическая микробиология является одной из интенсивно развивающихся научно-практических областей исследований, проводимых в настоящее время. Пробиотики предназначены для нормализации микробиоценоза ЖКТ организма.

На кафедре биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби был разработан иммобилизованный пробиотик «Рисо-Лакт» в виде сухой иммобилизованной лиофилизированной биомассы в ампулах. Пробиотик представляет собой смесь бактериальных штаммов лактобацилл *Lactobacillus acidophilus* AA-1, *Lactobacillus plantarum* AP-1, *Lactobacillus fermentum* AK-2R, а также сорбента на основе карбонизированной рисовой шелухи. Такого рода препарат обеспечивает адресную доставку интродуцируемых бактерий, их прикрепление к слизистой толстого кишечника с последующей нормализацией его микроэкологии.

Следовательно, целью исследования является – оценить биофизические параметры влияния иммобилизованного пробиотика БАД «Рисо-Лакт» на адгезивные свойства эпителиальных клеток кишечника крыс ИЕС-6 в отношении микробных клеток.

Эпителиальные клетки кишечника ИЕС-6 согласно протоколу выращивали в специальных чашках (Nunc Multidishes Nunclon, 152640). Образцы инкубировали и распределяли в микролунки прибора Micro Plate Reader (Bio-Rad Co., США) в количестве 200 мкл в каждую лунку и анализировали на приборе Micro Plate Reader (Ахенский университет прикладных наук, Германия).

Выяснилось, что в течение 2-х часов процесс адгезии бактериальных клеток происходит активно и оптическая плотность микробной суспензии в питательной среде значительно уменьшается на 50% по сравнению с контролем. Низкая оптическая плотность суспензии после инкубации интерпретировалась как низкий уровень концентрации бактериальных клеток и соответственно как наилучший эффект адгезии клеток. Результаты показывают, что сорбент и клетки штаммов лактобацилл, попадая в кишечник, прикрепляются к эпителиальным клеткам кишечника и проявляют пробиотическую активность.

Таким образом, получены убедительные данные об адгезивных свойствах иммобилизованного пробиотика «Рисо-Лакт» в системе *in vitro*.

Устойчивость эталонных образцов пробиотических штаммов к биологическим жидкостям

Кривошлык М.А., Сахнюк О.Н.

ГП «Государственный экспертный центр МЗ Украины», Киев, Украина

mkrivoshlik@mail.ru

В последние десятилетия пробиотические препараты получили широкое распространение в медицинской практике для коррекции дисбиотических состояний и стабилизации микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека. Изучено, что механизм действия пробиотиков обусловлен наличием у микроорганизмов, которые входят в их состав, целого ряда биологических функций. Одной из таких функций является способность выживать и сохранять свою активность в условиях низкой кислотности и в присутствии органических и желчных кислот ЖКТ.

Целью данной работы было изучение устойчивости к действию желудочного сока и желчи эталонных пробиотических штаммов в сравнении с производственными штаммами препаратов «Лактобактерин сухой» и «Бифидумбактерин сухой» производства ФГУП «НВО Микроген», Россия. Выживаемость штаммов *L. plantarum* и *B. bifidum* определяли по изменению количества КОЕ после совместной экспозиции с биологическими жидкостями при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$. Так, 1 мл взвеси эталонных штаммов бактерий и пробиотических препаратов с концентрацией 10^7 КОЕ/мл вносили в 9 мл биологической жидкости и выдерживали в термостате в течение 2 и 4 часов. Контролем служили те же образцы, которые выдерживались при таких же условиях в физиологическом растворе. Для интерпретации результатов образцы высевали на селективные питательные среды: лактобактерии – на плотную среду лактобакагар, бифидобактерии – на полужидкую бифидумсреду, и инкубировали при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48-72 часов.

Результаты эксперимента свидетельствуют, что активность эталонных штаммов *L. plantarum* и *B. bifidum*, также, как и пробиотических штаммов препаратов «Лактобактерин сухой» и «Бифидумбактерин сухой», практически не изменялась после совместной экспозиции с желчью и желудочным соком. Однако под действием желудочного сока в течение первых двух часов наблюдалось некоторое снижение количества клеток эталонного штамма *L. plantarum* и штамма препарата «Лактобактерин сухой» на 1-2 порядка, при этом количество составляло 10^5 - 10^6 .

Таким образом, в результате исследования было показано, что созданные нами эталонные штаммы пробиотических препаратов, так же, как и штаммы препаратов «Лактобактерин сухой» и «Бифидумбактерин сухой», обладают схожей активностью и являются устойчивыми к воздействию желудочного сока и желчи.

Влияние состава питательной среды на рост и антагонистическую активность штамма *Azotobacter vinelandii* ИБ 4 – основы биоудобрения «Азолен»

Леонтьева Татьяна Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

biolab316@yandex.ru

Известно, что основными нутриентами, лимитирующими рост и физиологическую активность культуры азотобактера, являются источники углерода и фосфора. Для улучшения накопления биомассы этим бактериям необходимы также факторы роста. Целью наших исследований являлось изучение влияния вышеназванных компонентов питательных сред на титр и антагонистическую активность штамма *Azotobacter vinelandii* ИБ 4, составляющего основу биоудобрения «Азолен».

Культуру выращивали при 28°C и $n = 180 \text{ мин}^{-1}$ на установке УВМТ-12-250 в колбах емкостью 250 мл со 100 мл питательной среды в течении 5 суток. Для определения оптимальных количеств компонентов среды использовали метод математического планирования эксперимента. За основу была взята классическая среда для выращивания бактерий р. *Azotobacter* (г/л): K_2HPO_4 - 0,2; K_2HPO_4 - 0,8; $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; FeCl_3 - 0,01; Na_2MoO_4 - 0,01; дрожжевой экстракт - 0,5; сахароза - 20. С целью удешевления питательной среды дрожжевой экстракт заменили на автолизат пекарских дрожжей.

Результаты исследований показали, что увеличение содержания в среде источников углерода и фосфора, а также факторов роста приводит к незначительному увеличению титра штамма и заметному снижению его фунгицидной активности. В то же время, в условиях лимитирования данных компонентов питательной среды наблюдается снижение титра штамма, при этом его антагонистическая активность остается на прежнем уровне. Отсутствие в среде факторов роста наибольшее влияние оказывает на накопление биомассы; титр культуры снижается в 4-5 раз, антигрибная активность – на 10%.

В результате экспериментов были получены уравнения, описывающие зависимость антигрибной активности и титра клеток штамма *Azotobacter vinelandii* ИБ 4 от концентраций в ферментационной среде источников углерода, азота и фосфора. На основании полученных данных с применением схемы «крутого восхождения» нами был установлен оптимальный

состав питательной среды для производства биопрепарата сельскохозяйственного назначения «Азолен» с высокой антигрибной активностью.

Отработка условий культивирования бактерий *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на жидкой фракции послеспиртовой барды

Лукаткин А.А., Ибрагимова С.А.

*ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», Биологический факультет, Саранск, Россия
ussr1960@yandex.ru*

В основе биологических способов защиты растений от фитопатогенов лежит явление микоза, осуществляемого хитинолитическими бактериями. Наибольший интерес представляют ризосферные бактерии, так как они лучше адаптируются к условиям среды, в которых фитопатогенные грибы поражают корни растений. Постоянно ведется работа по оптимизации условий культивирования и увеличению антифунгальной активности данных бактерий.

На кафедре биотехнологии Мордовского госуниверситета им. Н.П. Огарева ведется работа по изучению роста бактерий *Pseudomonas auerofaciens* 2006 при различных условиях культивирования. Проводилось исследование по использованию хитинсодержащих субстратов, как единственных источников углеродного питания. В качестве полимерных субстратов использовали хитин ракообразных и хитозан, которые переводили в коллоидное состояние. Культивирование проводили на минеральной среде без сахаров.

Показано, что рост и развитие исследуемого штамма бактерий зависят от структуры полимера. Так в период активного роста бактерий содержание биомассы в присутствии хитина составило 8,1 г/л (18 часов роста), а в присутствии хитозана – 6,5 г/л (20 часов роста). В процессе культивирования бактерий наблюдалось увеличение содержания редуцирующих сахаров в среде, максимальное количество которых отмечено в интервале 17-22 часов роста. Это соответствует 3,0-3,4% и 3,2-3,7% потребленного субстрата от массы внесенного хитина и хитозана соответственно. При расчете значений скорости гидролиза хитина и хитозана выявлено, что хитинолитическая активность бактерий высока в начальный период роста, когда в среде недостаточно углеродного компонента питания, а при достижении максимального роста бактерий – снижается. Большое содержание внеклеточного белка в среде с хитозаном коррелирует и с большей скоростью его гидролиза, и с большим содержанием редуцирующих сахаров в культуральной жидкости, на основании чего можно судить о лучшей ферментативной активности бактерий в данных условиях культивирования.

Таким образом, показана возможность использования полимерных субстратов – хитина и хитозана – как единственных источников углеродного питания при глубинном культивировании исследуемого штамма бактерий *Pseudomonas auerofaciens* 2006 на минеральной среде.

Эколого-микробиологические основы биорекультивации нефтезагрязнённых почв

Ляпина Ольга Сергеевна, Алонге Олавойе Олатунбосун

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва, Россия*

olyamay1971@mail.ru, oyinbosun2002@yahoo.com

Процессы добычи, транспортировки и переработки нефти сопряжены с серьезным экологическим риском – загрязнением окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. Для ускорения процессов естественной деградации нефтяного загрязнения существует множество методов, в том числе и биоаугментация – внесение в загрязнённую среду микроорганизмов, обладающих углеводородокисляющей активностью. Целью нашего исследования было выяснение режима влажности, оптимального для процессов биodeградации углеводов нефти в почве.

Объектами исследования служили дерново-подзолистая и черноземная почва, биопрепарат «Псевдомин», разработанный на кафедре микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, и дизельное топливо. Наблюдение за биологической активностью исследуемых почв велось методом посева на лабораторные среды и методом газоадсорбционной хроматографии. Остаточное количество нефтепродуктов в почве определялось методом ИК-спектрометрии. Для оценки степени нарушения равновесия в микробном сообществе использовали микробный метаболический коэффициент Q_r .

В ходе исследования была выявлена зависимость численности бактерий, использующих органические формы азота, в образцах с внесением препарата от уровня влажности почвы. Численность этой группы микроорганизмов во всех вариантах опыта с влажностью 60% ПВ была в 1,5-2 раза выше, чем в вариантах с 30-процентной влажностью.

Оценка устойчивости микробного сообщества нефтезагрязнённых почв дала следующие результаты: 1) При внесении нефтяного загрязнения и препарата наименее устойчивым оказывается микробоценоз дерново-подзолистой почвы при уровне влажности 30% ПВ – степень нарушения соответствует катастрофической ($Q_r > 5$). 2) Устойчивость микробного сообщества чернозёма выше (Q_r не превышает 3) и практически не зависит от влажности.

Результаты измерения остаточных количеств нефтепродуктов в почвах свидетельствуют о том, что в дерново-подзолистой почве максимум углеводородокисляющей активности микроорганизмы препарата проявляют при уровне влажности в 60%. Для чернозёмной почвы максимальный процент снижения содержания нефтепродуктов наблюдается при влажности в 30% от полной влагоёмкости.

Влияние биназы на некроз и апоптоз макрофагов в условиях экспериментального оксидативного стресса

Миронов В.А., Борисова Л.А.

Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия

kazan.vlad@gmail.com

Ранее нами было показано, что РНКазы *Bacillus intermedius* (биназа) оказывает модулирующее действие на генерацию макрофагами активных форм кислорода (АФК). Относительно высокие концентрации биназы подавляют, а низкие – стимулируют генерацию АФК фагоцитами *in vitro*. Учитывая тот факт, что АФК индуцируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) в клетке и развитие клеточной гибели, изучение влияния биназы на эти процессы в макрофагах представляет как фундаментальный, так и прикладной интерес.

В работе исследовано влияние биназы на развитие некроза и апоптоза перитонеальных макрофагов крысы в условиях оксидативного стресса, индуцированного H_2O_2 . Морфологические признаки апоптоза и некроза макрофагов анализировались с помощью оптического микроскопа после окрашивания клеток и клеточных структур специфическими красителями. Интенсивность реакций ПОЛ в клетках оценивалась методом Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции.

В условиях оксидативного стресса, индуцированного H_2O_2 , клетки в зависимости от концентрации H_2O_2 погибают путем некроза и/или апоптоза. Однако предварительная инкубация с биназой в концентрации 100 мкг/мл и выше приводила к снижению гибели макрофагов от некроза, индуцированного пероксидом водорода, а клетки вступали преимущественно на путь апоптоза. При этом в клетках наблюдалось снижение интенсивности процессов ПОЛ, как фактора повреждения мембран, по сравнению с клетками, находящимися в условиях оксидативного стресса, но не инкубированными с РНКазой, и повышался антиоксидантный потенциал исследуемой системы.

Протекторный эффект биназы может быть следствием стабилизирующего действия биназы на цитоплазматическую мембрану. О возможности стабилизации липидного бислоя свидетельствует изменение параметров фазового перехода дипальмитоилфосфатидилхолина в присутствии биназы, определённых в модельном эксперименте с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии. Вместе с тем нельзя исключить влияния биназы на систему передачи H_2O_2 – индуцированных проапоптогенных сигналов.

Молекулярно-генетическая детекция, характеристика и эпидемиологическое типирование бактерий - возбудителей хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ)

Нигматуллина Лилия Ралисовна

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

lili-nigmatullina@bk.ru

ХОБЛ относится к часто встречающимся заболеваниям человека и является важной медицинской и социальной проблемой, входя в число лидирующих причин временной нетрудоспособности и инвалидности. По данным ВОЗ, к 2020 году ХОБЛ будет занимать 5-е место по заболеваемости и 3-е в структуре смертности, и будет являться причиной до 4,7 миллионов смертей в год. В связи с этим, необходимо создание тест-систем на основе метода полимеразой цепной реакции (ПЦР) для практического применения в бактериологических лабораториях.

Материал и методы – мокрота, лаважная жидкость, ПЦР и электрофорез.

Для достижения поставленной в нашем исследовании цели производили подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК основных возбудителей ХОБЛ – генам 16S рРНК, депонированных в международных банках нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank/DBJ. Сравнительный множественный анализ найденных последовательностей проводили с использованием программы «MegAlign». При подборе праймеров использовали программу «PrimerSelect» из пакета компьютерных программ «Lasergene» (DNASTAR, Inc., США). Испытание на ДНК, выделенной из чистой культуры, показало, что разработанные праймеры являются высокоспецифичными и чувствительными, что является важным фактором при лабораторной диагностике ХОБЛ.

Таким образом, созданы и испытаны на клиническом материале диагностические системы для идентификации при помощи ПЦР возбудителей ХОБЛ.

Было выявлено, что полимеразная цепная реакция специфичнее и чувствительнее, чем бактериологический метод, исходя из результатов исследования.

Идентификация возбудителей ХОБЛ полученными тест-системами может стать основой при постановке диагноза и дальнейшего лечения больных. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине, в практическом здравоохранении, в лабораторной диагностике для выявления возбудителей.

Исследование резистентных к современным антибиотикам бактерий, выделенных из сточных вод в городе Кирове

Никитина Анна Александровна

Вятский государственный университет, Киров, Россия

oduvanchik2509@mail.ru

Помимо механических частиц и различных химических загрязнителей в водосток поступает огромное количество микроорганизмов, в том числе болезнетворных. В связи с этим сточные воды можно считать зеркалом санитарно-эпидемиологического благополучия населенного пункта.

Целью исследования является изучение антибиотикорезистентных форм микроорганизмов, выделенных из сточных вод г. Кирова. При этом наличие лекарственно устойчивых бактерий является удобным маркером, позволяющим оценить санитарное благополучие города.

Объектом исследования являются аэробные антибиотикорезистентные микроорганизмы, выделенные из сточных вод, поступающих на Кировскую станцию аэрации. В ходе исследования оценивали их устойчивость к 11 современным антибиотикам, относящимся к классам аминогликозидов, β-лактамов, тетрациклинов, макролидов и фторхинолонов.

Культуры, выделенные на питательном агаре с добавлением определенного антибиотика (2-6 МПК), переносили на ряд агаровых пластинок со всеми изучаемыми антибиотиками методом отпечатков. Всего было исследовано 235 изолятов. Устойчивость только к 1 антибиотику показали 7,83% изученных штаммов, к 2 – 7,37%, к 3 – 10,14%, к 4 – 11,06%, к 5 –

8,76%, к 6 – 9,68%, к 7- 8,76%, к 8 – 4,61%, к 9 – 7,83%, к 10 – 23,96%. В целом, доля устойчивых к антибиотикам форм микроорганизмов в сточных водах на разных стадиях их очистки составляет от 5,71 до 48,75%. Устойчивость к современным антибиотикам, таким как цефепим и моксифлоксацин, находится на достаточно низком уровне – 0,06-0,18%.

Большинство выделенных после биологической очистки штаммов обладают достаточно узким спектром устойчивости, сохраняя чувствительность к современным антибактериальным препаратам. Таким образом, биологическая очистка стоков эффективна не только как способ удаления различных загрязняющих веществ, но и как средство подавления развития болезнетворных микроорганизмов.

Полирезистентными считали бактерии, устойчивые к представителям двух и более классов антимикробных препаратов. Доля полирезистентных культур составила 91,71%. Отмечен также высокий процент перекрестной устойчивости к антибиотикам одного класса – до 95,54%.

Из полученных данных можно сделать вывод, что существует потенциальная опасность возникновения случаев инфекционных заболеваний, вызванных полирезистентными микроорганизмами сточных вод.

Образование микромицетом *Aspergillus ochraceus* протеиназ - активаторов протеина С плазмы крови в условиях твердофазного культивирования

Осмоловский Александр Андреевич

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,

Москва, Россия

aosmol@mail.ru

Твердофазное культивирование микроорганизмов представляет на сегодня стремительно развивающееся направление биотехнологии. Данный способ культивирования особенно хорошо применим к мицелиальным грибам и может быть определен как культивирование микроорганизмов на твердых увлажненных частицах в отсутствие свободной воды. Такие условия имитируют естественные условия обитания мицелиальных грибов. При этом по сравнению с глубинными условиями наблюдается более активный синтез биологически активных веществ микроорганизмами-продуцентами.

Было изучено образование микромицетом *A. ochraceus* протеиназ - активаторов протеина С – важного белка плазмы крови человека в условиях глубинного и твердофазного культивирования.

Продуцент выращивали в качалочных колбах с жидкой средой (при глубинном культивировании) и в конических колбах с разными субстратами твердой фазы, смоченными питательной средой (при твердофазном культивировании). В качестве твердой фазы использовали пшеничные отруби, пенополиуретан и силикагель. Активаторную к протеину С активность определяли с помощью хромогенного субстрата pGlu-Pro-Arg-pNA.

Показано, что микромицет хорошо развивался как в условиях глубинного, так и твердофазного культивирования. Активаторная активность твердофазной культуры была больше, чем при культивировании в глубинных условиях. При этом активность активаторов протеина С при развитии *A. ochraceus* на разных твердых субстратах различалась. Так, при росте на пшеничных отрубях и пенополиуретане активность была сопоставима с таковой в глубинных условиях, лишь незначительно превышая ее. При росте на силикагеле наблюдалось увеличение образования протеиназ - активаторов протеина С более чем в 2 раза по сравнению с глубинными условиями культивирования.

Действие летучих веществ почвенных бактерий на микроорганизмы

Попова Александра Антоновна

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

french@land.ru

Бактерии способны синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), которые могут подавлять рост других микроорганизмов. Предполагается, что летучие вещества бактерий могут играть существенную роль в антагонистических отношениях бактерий с другими микроорганизмами, занимающими те же экологические ниши. Кроме того, летучие вещества, образуемые бактериями, могут стимулировать рост растений, и продукция этих веществ может быть важной для защиты растений ассоциированными с ними бактериями от фитопатогенных микроорганизмов.

Нами было проведено исследование действия ЛОС бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* и их мутантов на фитопатогенные бактерии, фитопатогенные грибы, цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 и *Anabaena* sp. PCC 7120. Было определено, что летучие вещества бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* подавляют рост фитопатогенных бактерий и грибов, высоко чувствительны к ним оказались также цианобактерии. Изучено влияние мутаций в ряде бактериальных генов, кодирующих глобальные регуляторы генной экспрессии, на синтез ЛОС.

Для штамма *P. chlororaphis* 449 и ряда штаммов бактерий рода *Serratia* были определены компоненты смеси летучих веществ с помощью масс-спектрометрического анализа. Было выяснено, что в наибольшем количестве синтезируется вещество диметилдисульфид (ДМДС), а также ряд кетонов и алкенов. Было проанализировано действие индивидуальных ЛОС, синтезируемых продуцентами, а именно действие веществ: нонанона-2, гептанона-2, ундецена-1, ундеканона-2 и ДМДС.

При действии на *Agrobacterium* ДМДС, гептанон и нонанон сильно подавляют рост бактерий, причем в случае ДМДС воздействие бактериостатическое, а в случае кетонов – бактерицидное. Действие ундеканона-2 и ундецена-1 незначительно влияет на рост бактериальной культуры. Наиболее значительное ингибирование роста грибов *Rhizoctonia solani* наблюдалось при воздействии кетонов – нонанона-2 и гептанона-2, а также в значительной мере – ундеканона-2.

Микрофлора почвогрунтов зелёных зон города Калининграда с различным уровнем загрязнения

Садовников П.В.

Балтийский федеральный университет имени И. Канта, факультет биоэкологии,

Калининград, Россия

Sadovnikov90@gmail.com

Известно, что сильный антропогенный прессинг активно воздействует на микробное сообщество почвы, что приводит к нарушению естественного равновесия между отдельными группами микроорганизмов и, как следствие, ведет к деградации почв, минерализации гумуса, нарушению экологических функций почвы. Цель данной работы - изучение микрофлоры почвогрунтов зелёных зон г. Калининграда с различным уровнем загрязнения. Согласно карте комплексной оценки состояния окружающей среды территория города разделена на шесть зон, соответствующих определенному уровню загрязнения. В каждой зоне были заложены по пять тестовых участков. Отбор почвенных образцов, физико-химические исследования почвы и микробиологический анализ, включающий количественное содержание аммонифицирующих бактерий, азотфиксаторов, микромицетов, почвенных водорослей, актиномицетов и целлюлозоразлагающих микроорганизмов, проводили летом 2010 года по общепринятым методикам.

Проведённые исследования показали, что суммарный показатель количественного содержания анализируемых групп микроорганизмов в среднем по зонам варьировал в значительных пределах. Наибольшее содержание микроорганизмов отмечено в относительно чистой зоне и составило $2,34 \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы. В слабо загрязненной, умеренно загрязненной,

загрязненной и грязной зонах этот показатель был почти в 2 раза ниже и варьировал по зонам незначительно. В очень грязной зоне суммарное содержание микроорганизмов было минимальным - $6,05 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы, что в 4 раза ниже, чем в относительно чистой зоне. Доля актиномицетов от суммарного содержания анализируемых групп микроорганизмов составила от 57% в грязной зоне до 96% в очень грязной зоне. Широко представлены в структуре микробоценозов азотфиксирующие микроорганизмы рода *Azotobacter*, играющие важную роль в процессах самоочищения почвы. Наибольшее процентное содержание их отмечено в слабо загрязненной и грязной зонах и составило 33% и 36% соответственно. Таким образом, микрофлора почвогрунтов города Калининграда представлена большим разнообразием групп микроорганизмов, содержание которых варьирует в значительных пределах и зависит от уровня загрязнения.

Цитофлуорометрическая характеристика изменений морфофизиологических показателей бактерий при культивировании

Синягина Мария Николаевна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

marias25@mail.ru

Классическое построение кривых роста культур бактерий на основании данных светопоглощения не всегда позволяет адекватно проводить аналогии между значениями показателя оптической плотности на разных стадиях роста культуры, поскольку клетки одной культуры в разных фазах роста могут иметь различную рефрактерность. Популяции бактерий могут быть в некоторой степени охарактеризованы с помощью анализа показателей прямого и бокового светорассеяния клеток, полученных с применением проточной цитометрии.

Цитофлуорометрическим методом описана динамика изменений размеров и гранулярности клеток штаммов *Salmonella typhimurium* TA100, *Micrococcus luteus* и *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402 в ходе роста при периодическом культивировании.

Для всех изученных штаммов отмечено увеличение параметра бокового светорассеяния клеток в процессе роста. В ходе экспоненциальной фазы роста боковое светорассеяние клеток *Salmonella typhimurium* TA100 увеличивалось в 2 раза. К концу стационарной фазы роста превышение данного параметра над начальным значением составило 4 и 3 раза для клеток *Salmonella typhimurium* TA100 и *Micrococcus luteus*, соответственно. Боковое светорассеяние клеток *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402 при культивировании значительно не изменялось. Клетки штамма *Micrococcus luteus* достигли максимального размера в середине экспоненциальной фазы роста. Средний размер клеток данного штамма в стационарной фазе был меньше, чем в экспоненциальной фазе. Аналогичная закономерность изменений размеров наблюдалась и у клеток штамма *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402. В ходе роста культуры штамма *Salmonella typhimurium* TA100 наблюдалось увеличение среднего размера клеток на протяжении всего роста. В стационарной фазе и фазе отмирания показана морфофизиологическая гетерогенность популяций клеток исследованных штаммов.

Таким образом, можно сделать вывод, что рост микроорганизмов при периодическом культивировании характеризуется изменением размера и рефрактерности клеток. Полученные данные говорят о необходимости внесения дополнительных поправок на изменение указанных показателей для верификации данных, отражающих динамику роста культуры при периодическом культивировании.

Образование углеводов бактерий и генезис нефти

Строева Александра Романовна

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
Российский государственный университет нефти и газа имени И.М.Губкина,
Москва, Россия
stroeva@inbox.ru

Наиболее известным источником углеводов (УВ) является нефть. Все горючие углеводороды ископаемые возникли из органического вещества живых организмов, обитавших на Земле в прошлые геологические эпохи. Накапливаются сведения в пользу того, что первичным источником биогенной нефти являются прокариотические организмы, причем главная роль принадлежит анаэробам. В связи с этим исследовали образование УВ у представителей хемолитоавтотрофных и хемоорганогетеротрофных бактерий.

Изучали фракции УВ, выделенные гексаном из хлороформных экстрактов биомассы. УВ идентифицировали хромато-масс-спектрометрическим анализом.

Более разнообразен спектр УВ в нативной биомассе облигатно анаэробного термофильного хемолитоавтотрофа *Carboxydotherrmus* sp. SET-IS9, выделенного из горячих источников Исландии в лаборатории гипертермофильных микробных сообществ ИНМИ РАН имени С.Н. Виноградского. У него обнаружен н-гексадекан, алкены нонадецен, 1-эйкозен и 1-докозен, а также 2-бутил-4-диметилбензилфенол.

В нативной биомассе хемоорганогетеротрофов *Pseudomonas* RM и *Arthrobacter* RV выявлены алканы пентадекан и гексадекан, у артробактера – еще и гептадекан. Помимо УВ во всех исследованных образцах идентифицированы метиловые эфиры жирных кислот – гексадекановой (пальмитиновой) и октадекановой (стеариновой). Спектр УВ бактерий *Pseudomonas* RM и *Arthrobacter* sp. RV, подвергшихся мягкому термолизу, представлен алканами с длиной цепи от C₁₆H₃₄ до C₃₀H₆₂. Выдерживание биомассы *Pseudomonas* RM при 90-110°C в течение 2-3 ч способствовало образованию в результате термолиза сквалена – биомаркера нефти органического происхождения. Ранее сквален был обнаружен в нативной биомассе аэробных и аэротолерантных бактерий. Продукт превращения сквалена – гопан синтезируют представители различных групп бактерий.

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность прокариотической природы материнской нефти органического происхождения.

Скрининг лактобацилл в условиях стресса.

Тыныбаева И.К., Каирова М.Ж., Шайхин С.М.

РГП Республиканская коллекция микроорганизмов КН МОН РК, Астана, Казахстан
indiara@mail.ru

Молекулярные исследования адаптации лактобацилл к организму хозяина показали, что комбинации структур клеточной поверхности, шапероны, специальные регуляторные системы и экспортеры или ферменты определяют способность выживать у определенных штаммов лактобацилл, испытывающих кислый или желчевый стресс.

В настоящей работе были использованы штаммы *L. casei*, выделенные из кумыса, айрана, шубата. Уникальность штаммов подтверждают данные мультилокусного сиквенс-типирования. Штаммы *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum* ATCC 9338 из фонда Республиканской коллекции микроорганизмов Казахстана были взяты в качестве контрольной группы.

Культуры в стадии лаг-фазы с оптической плотностью 0,5 при длине волны источника 600 нм подвергали действию 0,3% желчи, инкубировали 30 минут и инокулировали на МРС (Лактобакагаре) в разведениях от 10³ до 10⁹ с 48 часовым проращиванием при 25⁰С. Аналогично проводили контрольный опыт без воздействия желчи.

В результате было обнаружено, что ряд культур проявляют резистентность к желчи, которая выражалась в способности к делению клеток после разведений от 10³ до 10⁶ раз, другие культуры проявляли чувствительность к действию желчи и не росли после таких разведений.

При этом показатели резистентности контрольных штаммов составили 10^4 , т.е. при таком разведении еще наблюдали рост бактерий. Показатель резистентности почти всех исследуемых штаммов *L. casei* составил 10^6 . Два штамма *L. casei* имели показатель резистентности 10^5 .

Скрининг *in vitro* на устойчивость к кислоте и желчи не всегда правильно предсказывает устойчивость *in vivo*. Это означает, что другие стрессы (осмотический и окислительный, недостаток питания и присутствие антимикробных продуктов, секретируемых конкурирующими микробами и клетками хозяина) также необходимо учитывать, когда выбираются потенциальные пробиотические штаммы. Тем не менее, тот факт, что многие пробиотические лактобациллы первоначально были выделены из желудочно-кишечного тракта, позволяет предполагать, что препараты лактобацилл преодолевают всевозможные проблемы выживания в жесткой среде при оральном введении.

Биологическая активность пространственно-затрудненных фенолов

Хаметшина Айгуль Рафаиловна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, Казань, Россия

aigulhametshina@mail.ru

Пространственно-затрудненные фенолы являются компонентами ряда лекарственных препаратов: противовоспалительных, некоторых кардиологических, антимикробных и антиаллергических средств. Также известно применение некоторых производных фенола для подавления секреции интерлейкина-1 и ослабления его побочных эффектов при использовании различных лекарственных форм для лечения псориаза, атеросклероза, сахарного диабета, воспалительных состояний и др. Цель нашей работы заключалась в исследовании биологической активности «гибридных структур» на основе пространственно-затрудненных фенолов, а также их комплексов с биометаллами (Cu, Co, Ni).

Биологическую активность пространственно-затрудненных фенолов и их металлокомплексов изучали в экспериментах с бактериальными культурами *Staphylococcus aureus* 209p, *Bacillus cereus* 8035, *Escherichia coli* F-50, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Оценивали антимикробные, бактериостатические и фунгистатические свойства веществ и определяли их токсичность по отношению к тестерному штамму *Salmonella typhimurium* TA100 с целью дальнейших исследований соединений на мутагенность в классическом тесте Эймса.

В ходе работы было установлено, что процент выживаемости штамма *Salmonella typhimurium* TA100 в эксперименте на токсичность пяти разных веществ семейства пространственно-затрудненных фенолов составляет не выше 57%. Антимикробное действие веществ в экспериментах на перечисленных выше штаммах различалось в зависимости от пространственного строения вещества. Большинство соединений показало хорошую фунгистатическую и бактериостатическую активность.

Полученные результаты позволяют нам сделать выводы о достаточно высокой токсичности исследуемых соединений. Показано, что металлокомплексы обладают более высокой активностью, чем соединения без металла. Кроме того, мы можем сделать вывод, что биологическая активность пространственно-затрудненных фенолов и их металлокомплексов существенно зависит от их пространственной структуры.

Получение биосовместимых структур на основе лактобацилл и магнитных наночастиц: перспективы создания пробиотиков нового поколения

Хузахметова Венера Равиловна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Venus154@mail.ru

В течение последних лет изучение взаимодействия клеток с наноматериалами представляет особый интерес, поскольку может быть использовано для регуляции физиологической активности клеток и изменения их свойств. Для магнитных наночастиц окиси

железа показано, что они являются многообещающим инструментом для разделения и очистки биологических молекул и клеток, доставки лекарственных препаратов, а также применяются в тканевой инженерии. В связи с этим актуальной представляется магнитная функционализация клеток пробиотических лактобактерий с целью придания им новых свойств. Целью работы явилась оценка эффектов магнитной модификации на жизнеспособность и пробиотические свойства бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3.

Магнитную функционализацию клеток *L. plantarum* 8P-A3 осуществляли с помощью стабилизированных полиаллиламином гидрохлоридом магнитных наночастиц диаметром 15 нм. Оценка жизнеспособности клеток, проведенная методом окрашивания флуоресцентными индикаторами LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, показала, что соотношение живых и мертвых бактерий не отличается в образцах интактных и магнетизированных лактобацилл.

Магнетизированные клетки образуют агрегаты, что является нежелательным следствием модификации. Нами была подобрана концентрация клеток бактерий, при которой количество агрегатов минимально: так, при концентрации клеток 10^3 наблюдали максимальное количество отдельных клеток, а при концентрациях на 2-3 порядка выше наблюдали клетки только в агрегированном состоянии. Эффекты магнетизации в отношении пробиотических свойств лактобацилл оценивали по ее воздействию на адгезивную активность бактерий и гидрофобные свойства клеточной поверхности, как факторы пробиотического потенциала штамма. С помощью световой микроскопии обнаружили, что у магнетизированных бактерий *L. plantarum* 8P-A3 адгезия на буккальных эпителиоцитах на 51% выше, чем у интактных клеток. Гидрофобность клеточной поверхности, измеренная по степени связывания бактерий с предельным углеводородом гексадеканом, при этом возросла на 5%.

Таким образом, модификация бактерий *L. plantarum* 8P-A3 магнитными наночастицами не оказывает токсического действия на лактобактерии и увеличивает их адгезивную активность. Данный подход открывает перспективы практического манипулирования клетками лактобацилл с целью усиления их пробиотического потенциала.

Влияние цветных металлов на штаммы литотрофных окисляющих железо бактерий

Черкасова Дарья Владимировна¹, Гареева Альбина Мударисовна²

*ФГБУН Институт биологии Уфимского научного центра РАН, ГОУ ВПО Уфимский
государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия*

biolab316@yandex.ru

Микроорганизмы, предназначенные для биологического выщелачивания цветных металлов из отработанных руд должны обладать устойчивостью к действию ионов этих металлов.

Целью нашей работы было изучение влияния возрастающих концентраций цинка, меди и марганца на литотрофные бактерии, способные к окислению сульфидных руд.

Испытания по воздействию ионов металлов на штаммы литотрофных бактерий проводили на среде DSM 882 с дополнительным внесением сульфата цинка, меди и марганца в концентрациях от 1 г/л до 70 г/л. В качестве объекта для сравнения был использован типовой штамм *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Тестируемые штаммы были выделены: *A. ferrooxidans* ИБ 2 – из подотвальной воды Сибайского филиала Учалинского ГОК, *A. ferrooxidans* ИБ 7 – из подотвальных вод Учалинского горно-обогатительного комбината, *A. ferrooxidans* ИБ 8 – из почв, прилегающих к отвалам Учалинского ГОК, *A. ferrooxidans* ИБ 13 – из лежалой руды с территории Медногорского медно-серного комбината.

Наибольшей устойчивостью к ионам металлов обладал штамм ИБ 13. Он был способен расти в растворах с концентрацией цинка до 70 г/л, меди до 16 г/л, марганца 55 г/л. Меньшей устойчивостью к металлам обладали штаммы ИБ 2, ИБ 7 и ИБ 8. Рост штамма ИБ 2 не подавлялся цинком в количестве 65 г/л, ИБ 7 – 40 г/л и ИБ 8 – 50 г/л, соответственно. Все аборигенные штаммы были способны выдерживать присутствие ионов меди в концентрации до 10 г/л. Для роста штаммов ИБ 2 и ИБ 7 максимально возможная концентрация марганца

составила – 40 г/л, для штамма ИБ 8 – 35 г/л. Типовой штамм *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 был устойчив к концентрации ионов цинка 6 г/л, меди и марганца – 2 г/л.

Таким образом, из протестированных штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans* ИБ 13 был более устойчив к ионам цинка, меди и марганца. Однако устойчивость штаммов ИБ 2, ИБ 7, ИБ 8 к металлам также была достаточно высока, что позволяет рекомендовать их для биологического выщелачивания полиметаллических руд.

Биотехнологические методы деструкции нефтешламов

Чореклиева Кристина Мурадовна

Российский Государственный Университет нефти и газа имени И.М. Губкина, Москва, Россия

istinam@mail.ru

На предприятиях нефтегазового комплекса России накоплено несколько десятков миллионов тонн нефтешламов. Вопросы их переработки и обезвреживания выступают на первый план в условиях происходящего эколого-правового регулирования. Шламы нефтепереработки по составу чрезвычайно разнообразны и представляют собой тяжелые нефтяные остатки, содержащие в среднем по массе 10-60% нефтепродуктов, 30-85% воды, 2-45% твердых примесей. Наиболее эффективными и экологически чистыми являются биотехнологические методы деструкции и детоксикации нефтешламов.

Объектами исследования стали три образца асфальто-смолисто-парафиновых отложений (АСПО), кислый гудрон и мазут с заводов средней полосы России. Применяли следующие методы: получение Са-альгинатных гранул и ПАВ-реагентов *Pseudomonas aeruginosa* RM (низкомолекулярный) и *Acinetobacter sp.* 15 (высокомолекулярный), хроматографические методы (ВЭЖХ) определения группового состава интактных и модифицированных нефтешламов, методы культивирования и идентификации аборигенной микробиоты. В результате экспериментов установлено, что на всех исследованных нефтешламах обитают углеводородокисляющие бактерии. При выдерживании образцов нефтешламов в жидкой среде с минеральными солями наблюдали развитие аборигенных ассоциаций бактерий за счет углеводородов нефтешламов.

Выявлено, что эффективность биодеструкции нефтешламов напрямую связана со степенью их диспергирования. Его осуществляли разными способами: АСПО – в альгинате, кислый гудрон и мазут – в биореагентах. Через 7 сут. культивирования наблюдали разрушение АСПО в Са-альгинатных гранулах за счет развития микробиоты. Биореагент *Acinetobacter sp.* 15 лучше эмульгировал мазут, чем ПАВ *Pseudomonas aeruginosa* RM. Труднодиспергируемый кислый гудрон изменял свою физико-химическую структуру после выдерживания в обоих ПАВ-биореагентах. Обнаружено, что деструкции подвергаются все группы углеводов исследованных АСПО, включая высокотоксичные смолы, асфальтены и полиароматику, при этом их содержание уменьшается на 12-54%. Из проведенной работы следует, что такие агрессивные субстраты, как нефтешламы различной этиологии, можно обезвреживать путем стимуляции развития аборигенной микробиоты нефтешламов после их предварительного диспергирования или подготовки с применением ПАВ-биореагентов.

Морфологическая характеристика колоний спонтанных вариантов *Penicillium varians* – продуцента глюкозооксидазы

Шахнович Е.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

enzyme@mbio.bas-net.by

Грибы рода *Penicillium* – промышленные продуценты ряда ферментов, среди которых необходимо выделить глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4.), используемую в медицине, промышленности, научных исследованиях. Для грибов характерна гетерогенность, обеспечивающая их приспособляемость к меняющимся условиям среды обитания и представляющая серьезное препятствие при промышленном использовании штаммов-

продуцентов. Одним из широко применяемых критериев для выявления полиморфизма грибов является сравнительный анализ морфологических признаков колоний.

Цель данной работы – охарактеризовать морфологические особенности колоний спонтанных вариантов *Penicillium varians* – продуцента глюкозооксидазы.

Гетерогенность *P. varians* изучалась в течение 7 месяцев при использовании цитологического метода с последующим определением особенностей роста гриба на наборе агаризованных питательных сред (Чапека, Райстрика и сусло). Для оценки морфологической стабильности *P. varians* в течение 5 вегетативных пассажей пересеивался на указанные среды. В пятой генерации штаммы с каждой из перечисленных сред высевали на среду Чапека.

В результате сравнительного анализа показано, что гриб гетерогенен, в рассевах его популяции выявлены варианты с отличающимися по морфологическим признакам колониями: на среде Чапека – 3 варианта, на среде Райстрика и на сусло-агаре – по 2 варианта. Установлены морфологические особенности колоний спонтанных вариантов *P. varians*, определены основные типы колоний. Выявлено также, что спонтанные варианты *P. varians* характеризуются различной скоростью роста.

Таким образом, изучение спонтанной изменчивости *P. varians* показало, что гриб вариабелен и расщепляется на 7 вариантов, различающихся по макроморфологическим признакам колоний и скорости роста. Планируемые исследования продукции глюкозооксидазы выявленными вариантами *P. varians* позволят отобрать наиболее активный штамм для дальнейшей селекционной работы.

Анализ пробиотических и адаптационных факторов на примере изолятов лактобацилл из различных сыров

**Шоныхбаева С.С., Каирова М.Ж., Молдагулова Н.Б.,
Байбурина Ж.М., Шайхин С.М.**

*РГП Республиканская коллекция микроорганизмов КН МОН РК, Астана, Казахстан
rkm_shaikhin@mail.ru*

Существуют две основные категории факторов, которые оптимизируют пробиотические функции лактобацилл. Во-первых, это факторы, которые позволяют адаптироваться в новой нише организма хозяина, которую бактерии временно заняли (адаптационные факторы). Во-вторых, факторы, которые непосредственно производят лечебный эффект (пробиотические факторы). Лактобациллы относятся к молочнокислым бактериям (МКБ) и широко используются в молочной промышленности. Род *Lactobacillus* включает в себя большую гетерогенную группу грамположительных, не образующих спор, анаэробных бактерий с низким содержанием GC. Таксономически, род *Lactobacillus* принадлежит к типу *Firmicutes* класса бацилл и порядка *Lactobacillales*, семьи *Lactobacillaceae*.

В работе были использованы девять изолятов МКБ из коммерчески доступных сыров различных сортов. Кислотообразующую, антагонистическую, протеолитическую, лизоцимную и адгезивную активности изолятов молочнокислых бактерий определяли по общеизвестным методикам. Родовая и видовая принадлежность лактобацилл устанавливалась по результатам секвенирования гена 16S рДНК.

Анализ пробиотических и адаптационных факторов у исследуемых МКБ показал, что они обладают высокой антагонистической активностью по отношению к пяти тест-культурам (*S. typhimurium*, *St. aureus*, *E. coli*, *Kl. ozaenae*, *Pr. mirabilis*). МКБ не обладают лизоцимной активностью и проявляют высокую кислотообразующую активность (100-270 °Т), которая коррелирует с внеклеточной протеолитической активностью. Из всех исследованных изолятов лактобацилл 4 обладали высокой степенью адгезивности к клеткам эритроцитов, отражающей адаптационные свойства пробиотика. Таким образом, анализ показал различия в пробиотических и адаптационных факторах исследованных изолятов, и наиболее активные культуры были взяты на депонирование в качестве культур, обладающих пробиотическими свойствами.